

VU Research Portal

A new target for an old enemy

Ortega Ugalde, S.

2020

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Ortega Ugalde, S. (2020). *A new target for an old enemy: The Cytochrome P450 system from Mycobacterium tuberculosis*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

Medicijnresistentie is een steeds groter wordend probleem voor de behandeling van tuberculose (TB). De identificatie van nieuwe targets voor medicijnen heeft dan ook een hoge prioriteit. Sinds de sequentie van het genoom bekend werd, is onderzoek naar het Cytochroom P450 (CYPs) systeem van *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is gestart. In dit genoom was, voor een pathogene bacterie, een hoge dichtheid van voor CYP coderende genen te zien. Later werd echter bekend dat deze hoge dichtheid van CYPs een van de algemene karakteristieken van mycobacteriën als *M. avium* 104 (48), *M. smegmatis* MC2 (42) en *M. marinum* (47) is. Onderzoek naar welke van deze genen essentieel is, wees uit dat alleen het elektronentransporteiwit FdxC (*Rv1177*) essentieel is voor de groei van Mtb onder standaard laboratorium condities. Studies met transposoninserties hebben echter aangetoond dat, door het nabootsen van de condities die de bacterie tegen kan komen tijdens infectie van de mens, er een paar essentiële CYP-systeem coderende genen zijn, zoals *cyp1215a1*. Dit suggereert dat onderdelen van het CYP-systeem een belangrijke rol spelen bij de levensvatbaarheid en besmettelijkheid van Mtb.

In dit proefschrift dragen we bij aan het begrijpen van 1) de moleculaire interacties tussen verwante elektronentransportpartners en Mtb CYPs onder normale groeiomstandigheden (laboratorium); 2) het gebruik van gekarakteriseerde humane CYP “probe” substraten voor de ontwikkeling van high-throughput assays, gebaseerd op de enzymactiviteit van Mtb CYPs; en 3) een nieuwe strategie om essentiële Mtb CYPs permanent te kunnen remmen door gebruik te maken van remmers die effect hebben op het mechanisme.

Hoofdstukken 1 en 2 introduceren de pathogenese van TB veroorzaakt door Mtb. De huidige behandelwijzen, kosten en bijwerkingen van verschillende antibiotica tegen TB worden beschreven. Maar ook de steeds vaker voorkomende verminderde werkzaamheid van deze medicijnen tegen resistente stammen. Het algemene mechanisme van de CYP katalytische cyclus en gemeenschappelijke elektronentransporteiwitten worden uitgelegd. Een gedetailleerde beschrijving van de netwerken van de expressie van Mtb CYPs en de verwante redoxpartners als reactie op verschillende externe stimuli die de bacterie tegenkomt tijdens infectie van de gastheer, zoals nutrient depletie, hypoxie en antibiotica wordt gegeven in **hoofdstuk 2**. Overproductie van de transcriptieregulators die betrokken zijn bij de overleving van Mtb tijdens de latente fase, zoals WhiB2, WhiB3 and SigF, leidt tot een uniek profiel van CYP-expressie. Dit onthult de betrokkenheid in de adaptieve reactie en overleving van Mtb (**figuur 2, hoofdstuk 2**). De door stress veroorzaakte genetische afdruk van het Mtb CYP systeem tijdens blootstelling aan lage concentraties van eerste- en tweedelijns antibiotica wordt ook beschreven in **hoofdstuk 2**, hier wordt duidelijk dat *cyp121a1*, *cyp126a1*, *cyp137a1*, *cyp139a1*, *cyp143a1*, samen met *fdxB* en *fdxE* de meest prominente genen zijn voor de in die studie geteste 5 medicijnen. Dit suggereert dat deze genen betrokken kunnen zijn bij de aanpassing van het pathogeen voor antibiotica. In tegenstelling tot het cluster genen met de sterkste downregulatie van transcriptie, *cyp135b1*, *cyp130a1*, *cyp123a1*, en *cyp125a*, met de elektronentransporteiwitten gecodeerd voor de genen *fdxC* en *fdxD*.

De studie die wordt beschreven in **hoofdstuk 3** focust zich op de functionele karakterisatie van het zogenaamde weesgen Mtb CYP130A1. Dit enzym is een potentiële target voor medicijnen omdat het coderende gen, *Rv1256c*, niet aanwezig is in het genoom van de verwante, maar voor mensen veel minder pathogene, *M. bovis*. Om deze reden zou CYP130A1 een rol kunnen spelen in de virulentie en besmettelijkheid van de humane gastheer. De afwezigheid van endo- en exogene substraten en functionele redoxpartners heeft echter het onderzoek naar de fysiologische rol belemmerd. Een fusie-eiwit tussen CYP130A1 en het reductasedomein van cytochrome P450 BM3 van *Bacillus megaterium* werd ontwikkeld en een lijst van bekende substraten voor CYPs van zoogdieren en bacteriën werd gescreend. Dit resulteerde in

de identificatie van de N-demethylatie van dextromethorphan (DXM) als de eerste oxidatieve reactie gekatalyseerd door Mtb CYP130A1. Deze experimentele bevinding werd ondersteund door computationele studies. Deze lieten zien dat er stabiele bindingsposities van DXM op de actieve plaats van CYP130A1 zijn die consistent waren met de N-demethylatiereactie. Analyse van de enzymkinetische parameters van de N-demethylatiereactie lieten een typische Michaelis-Menten curve zien met een K_M van $143 \pm 11 \mu\text{M}$ en een k_{cat} of $1.3 \pm 0.1 \text{ nmol product/min/nmol CYP}$. Reconstitutie van het oorspronkelijke CYP130A1 met het reductasedomein van BM3 had een 66x lagere activiteit vergeleken met het fusie-eiwit. Wanneer alleen het BM3 reductase domein was toegevoegd was er een 20x zoveel molaire overmaat nodig.

Het redoxsysteem van Mtb CYPs behoort tot de eerste klasse, waar de katalytische activiteit afhankelijk is van een NAD(P)H ferredoxin reductase (FNR) en een ferredoxin (Fd). Analyse van het genoom van Mtb onthulde de codering die mogelijk is voor vijf ferredoxins: Fdx (*Rv0763c*), FdxA (*Rv2007c*), FdxC (*Rv1177*), FdxD (*Rv3503c*), en Rv1786; twee FNRs: FdrA (*Rv0688*) en FprA (*Rv3106*) en twee Fd-FNR fusie-eiwitten, FdxB (*Rv3554*) en FprB (*Rv0886*), deze gedragen zich als elektronenoverdrager van CYPs. Ondanks de identificatie van verscheidene vermoedelijke redoxpartners in Mtb, surrogaat elektronenoverdracht is gebruikt om de Mtb CYP-activiteit te reconstrueren. Als gevolg hiervan is de betrokkenheid van de redoxpartners in het specifieke en essentiële biosynthetische pad, gekatalyseerd door Mtb CYPs, nog niet onderzocht. Het onderzoek dat beschreven is in **hoofdstuk 4** gaat over de biochemische karakterisatie en identificatie van de verwante redoxpartners voor Mtb CYPs. Hiervoor zijn alle vermoedelijke Mtb FNRs en ferredoxins, behalve FdxC gekloneerd en heteroloog geëxprimeerd in *E. coli*. De bepaling van de enzymkinetische parameters voor cytochroom c-reductie lieten zien dat vooral FdxD, gevolgd door FdxA and FdxE, voornamelijk inwerkte op het NADH-FdrA systeem en een efficiënte elektronenoverdrachtsketen vormde. Fdx bleek de voorkeurspartner voor NADPH-FprA te zijn. Deze voorkeuren tussen de twee elektronenoverdrachtspartners waren echter niet waargenomen in het complete CYP:FNR:Fd katalytische systeem, dit suggereert dat de elektronenoverdracht van Fd naar CYP de snelheidsbeperkende factor is. Van de onderzochte endogene ferredoxins waren alleen de [3Fe-4S] ijzer-cluster ferredoxins in staat om de elektronenoverdracht naar CYPs te ondersteunen. Fdx was in staat om als een redoxpartner voor zowel CYP121A1 als CYP51B1 te dienen, zoals ook al eerder waargenomen is door anderen. FdxE koppelde met alle cholesterol metaboliserende CYPs (CYP124A1, -125A1 and -142A1), terwijl FdxD interactie had met alle CYPs die geselecteerd waren voor de studie (**figuur 6, hoofdstuk 4**).

Hoofdstuk 5 beschrijft de evaluatie van luminogene substraten die als potentieel probe-substraat kunnen dienen voor Mtb CYPs. Dit zou kunnen helpen met de identificatie van remmers voor deze enzymen. Zeventien pro-luciferines zijn getest voor de vijf meest relevante Mtb CYPs: CYP121A1, -124A1, -125A1, -130A1 en -142A1. Luciferin-BE was geïdentificeerd als een probe-substraat voor CYP130A1. De geschiktheid voor een high throughput screening was bevestigd door een hoge Z' -factor (0.87) en een hoge signaal-tot-achtergrondratio. Door dit substraat te gebruiken konden de inhibitie-eigenschappen (IC_{50}) van een selectie van bekende remmers worden bepaald. Het gebruik van minder enzym en minder tijd is mogelijk vergeleken met de tot nu toe gebruikte methodes. De relatieve lage luminescentie voor de andere Mtb CYPs belemmerde het opzetten van een high throughput methode die de gescreende luminogene compounds als probe substraten. Van de twintig CYP genen in het Mtb genoom wordt Mtb CYP121A1 overwogen als meest veelbelovende drug target. Tot nu toe zijn fragmentgebaseerde bindingsstudies uitgevoerd voor CYP121A1, dit bracht selectieve en hoge affiniteit remmers op (K_D gelijk aan 15 nM). Het mechanisme van deze remmers is echter reversibel door de snelle associatie en disassociatie van de parent drug en de actieve bindingsplaats van het CYP enzym.

Het onderwerp van **hoofdstuk 6** was de ontwikkeling van op het mechanisme gebaseerde remmers voor CYP121, die leidden tot een irreversibele remming van CYP121A1. Om deze reden wordt verwacht dat de remming van langere duur zal zijn vergeleken met de reversibele remmers. Om dit doel te bereiken is een verzameling van voorlopige suïcidale remmers gesynthetiseerd door een acetyleengroep te introduceren aan het endogene substraat van CYP121A1, cYY. Een aantal van deze cYY-analogen kon binden aan CYP121A1, met een vergelijkbare sterkte als cYY via een Type I binding met de heemgroep, dit is indicatief voor een substraatachtige binding die voorwaardelijk is voor een mechanisme gebaseerde inhibitie. Twee acetyleen gesubstitueerde cYY analogen waren in staat om tijdsafhankelijk de katalytische activiteit van CYP121A1 irreversibel te remmen door middel van een covalente modificatie van CYP121A1. De twee cYY analogen toonden echter een lage antimycobacteriële activiteit *in vitro* ($MIC_{90} > 5000 \mu M$), dit kan worden verklaard door een gelimiteerde cellulaire opname, zoals werd bevestigd in een Mtb stam met een hogere buiten membraan permeabiliteit (Mtb H37Rv MspA⁺). Om deze reden is ontwikkeling van meer permeabele mechanisme gebaseerde remmers nodig om de antimycobacteriële activiteit te verhogen.